

## Device for the separation and determination of agglutinated erythrocytes in a single step

**Patent number:** EP0542655  
**Publication date:** 1993-05-19  
**Inventor:** MAJUREL MARC (FR)  
**Applicant:** BOY JACQUES INST (FR); BOY JACQUES INST (FR)  
**Classification:**  
- **International:** B01L3/14; G01N33/555  
- **European:** B01D39/16K; B01L3/00C6C; G01N33/50B  
**Application number:** EP19920440126 19921112  
**Priority number(s):** FR19910014061 19911112

**Also published as:**

FR2688311 (A1)

EP0542655 (B1)

**Cited documents:**

US4933092

EP0325910

EP0131934

EP0269240

JP62097603

[Report a data error here](#)**Abstract of EP0542655**

Device for the separation and determination of agglutinated erythrocytes in a single step during agglutination tests. It comprises at least one capillary tube open at its lower end, which is equipped with a filter consisting of a composite membrane surmounted by a layer, with a thickness of 2 to 3 mm, of glass microbeads with a mean diameter of between 20 and 50  $\mu\text{m}$ , the said composite membrane comprising the three following successive layers: - a first, very hydrophilic layer, with a porosity of 5 to 7  $\mu\text{m}$ , in contact with the glass microbeads. - A second, moderately hydrophobic, intermediate layer. - A third, highly hydrophobic, external layer pierced at its centre with an orifice with a diameter of approximately 0.1 mm. I

---

Data supplied from the esp@cenet database - Worldwide

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



(11) Numéro de publication : **0 542 655 A1**

(12)

**DEMANDE DE BREVET EUROPEEN**

(21) Numéro de dépôt : **92440126.8**

(51) Int. Cl.<sup>5</sup> : **G01N 33/555, B01L 3/14**

(22) Date de dépôt : **12.11.92**

(30) Priorité : **12.11.91 FR 9114061**

(43) Date de publication de la demande :  
**19.05.93 Bulletin 93/20**

(84) Etats contractants désignés :  
**AT BE CH DE DK ES FR GB GR IT LI LU MC NL  
PT SE**

(71) Demandeur : **INSTITUT JACQUES BOY**  
**45, rue Cognacq Jay**  
**F-51000 Reims (FR)**

(72) Inventeur : **Majurel, Marc**  
**Route de Brienne**  
**F-08190 Poilcourt Sydney (FR)**

(74) Mandataire : **Arbousse-Bastide, Jean-Claude**  
**Philippe**  
**CABINET ARBOUSSE BASTIDE 20, rue de**  
**Copenhague**  
**F-67000 Strasbourg (FR)**

(54) **Dispositif permettant de réaliser en un seul temps la séparation et la mise en évidence des agglutinats érythrocytaires.**

(57) Dispositif permettant de réaliser en un seul temps la séparation et la mise en évidence des agglutinats érythrocytaires lors des tests d'agglutination.

Il comprend au moins un tube capillaire ouvert à son extrémité inférieure, laquelle est munie d'un filtre constitué d'une membrane composite surmontée d'une couche de 2 à 3 mm d'épaisseur de microbilles de verre de diamètre moyen compris entre 20 et 50  $\mu$ m, ladite membrane composite comprenant les trois couches successives suivantes :

— une première couche très hydrophile, de porosité 5 à 7  $\mu$ m, au contact des microbilles de verre.

— une seconde couche, intermédiaire, modérément hydrophobe.

— une troisième couche, externe, fortement hydrophobe, percée en son centre d'un orifice d'environ 0,1 mm de diamètre.

**EP 0 542 655 A1**

La présente invention a pour objet un dispositif permettant en un seul temps la séparation d'agglutinats érythrocytaires des hématies libres lors d'un test d'agglutination, et la mise en évidence desdits agglutinats.

On sait que, en immuno-hématologie érythrocytaire, la réaction antigène-anticorps peut être mise en évidence grâce à la présence d'agglutinats. Cette agglutination, spontanée en milieu salin, n'est toutefois pas toujours observable in vitro, notamment dans le cas où les anticorps sont des anticorps dits sensibilisants, les hématies sensibilisées ne donnant pas lieu à une agglutination.

Afin de provoquer l'agglutination des hématies sensibilisées, diverses techniques ont été mises au point, parmi lesquelles les plus couramment utilisées consistent à ajouter au milieu réactionnel :

- soit des macromolécules comme l'albumine, le dextran ou la polyvinylpyrrolidone;
- soit, après lavage des hématies sensibilisées, une antiglobuline humaine (test de Coombs) ;
- soit une molécule polycationique comme le bromure d'hexadiméthrine, ou "polybrène", le traitement de l'agglutinat ainsi obtenu par une solution citratée provoquant la remise en suspension des hématies non sensibilisées (technique de Lalezari).

Une autre technique consiste à traiter préalablement les hématies par une enzyme protéolytique comme la papaïne, la broméline ou la trypsine.

Toutes ces techniques d'agglutination peuvent être mises en oeuvre manuellement ou automatiquement, dans les supports les plus variés : tubes à hémolyse, plaques de verre, rhéuscope, microplaques à 96 puits.

Toutefois, elles font généralement appel à une centrifugation et tant les phases de lavage (pour le test de Coombs) que les temps et vitesses de centrifugation ainsi que le type d'agitation pour la remise en suspension finale constituent des paramètres critiques qui rendent la maîtrise de ces réactions délicate.

D'autre part, les dispositifs mis en oeuvre dans ces techniques de séparation et de mise en évidence des agglutinats érythrocytaires sont peu nombreux.

Graham et al. a proposé en 1982 un tube capillaire spécifique que l'on remplit d'une solution d'albumine et de dextran, de densité intermédiaire entre sérum et globules, toutefois cette technique ne s'est pas révélée plus sensible que le test de Coombs classique.

Une autre technique dite "en phase solide", a été présentée en 1984 au symposium de Munich par une équipe française, MULLER A. et al., consistant à centrifuger le mélange sérum-globules à travers un liquide de séparation, après que les puits des microplaques utilisées aient été revêtus d'antiglobuline, la lecture étant faite automatiquement.

Le brevet français 2 577 321 décrit une méthode

dans laquelle le milieu de séparation est constitué d'un gel à base de dextran, toutefois cette méthode, comme la plupart des méthodes antérieurement proposées, fait appel à une centrifugation, avec l'inconvénient inhérent à la mise en oeuvre de ce type de technique, à savoir de nécessiter un matériel qui ne peut être transporté hors du laboratoire.

La présente invention a pour but de remédier à ces divers inconvénients des techniques connues en proposant un dispositif qui permet en un seul temps la séparation et la mise en évidence des agglutinats érythrocytaires, en évitant le recours à une centrifugation.

La présente invention a ainsi pour objet un dispositif permettant la séparation et la mise en évidence des agglutinats érythrocytaires, ledit dispositif présentant la caractéristique essentielle de comprendre au moins un tube capillaire ouvert à son extrémité inférieure, laquelle est munie d'un filtre constitué d'une membrane composite surmontée d'une couche de microbilles de verre de 2 à 3 mm d'épaisseur.

Selon une autre caractéristique du dispositif selon l'invention, les microbilles de verre mises en oeuvre présentent un diamètre moyen compris entre 20 et 50 microns, tandis que la membrane composite qui obture le tube capillaire à son extrémité inférieure présente une ouverture de mailles de 5 à 7 microns, autorisant le passage des seuls globules rouges non agglutinés.

Selon une caractéristique additionnelle du dispositif selon l'invention, la membrane composite mise en oeuvre pour obturer le tube capillaire à son extrémité inférieure est constituée des trois couches ci-après :

- une première couche très hydrophile au contact des microbilles.
- une couche intermédiaire modérément hydrophobe
- une couche externe fortement hydrophobe percée en son centre d'un orifice d'environ 0,1mm de diamètre pour l'écoulement du flux de la phase mobile.

La première couche de la membrane composite du dispositif selon l'invention est constituée d'un matériau très hydrophile tel qu'un polyamide 66, présentant une ouverture de mailles de 5 à 7 microns. Cette première couche détermine la porosité de la membrane composite.

La couche intermédiaire de ladite membrane composite est constituée d'un matériau fibreux modérément hydrophobe, tel qu'un polypropylène, qui empêche l'écoulement du liquide pendant la phase d'incubation et assure d'autre part une fonction de drainage de la phase mobile pendant l'écoulement.

La couche externe de la membrane composite du dispositif selon l'invention est constituée d'un matériau fortement hydrophobe, comme un polymère de tétrafluoroéthylène.

Selon un premier mode de réalisation de l'invention, le dispositif comprend un tube capillaire d'environ 60 mm de hauteur et d'un diamètre interne d'environ 2 mm, réalisé en un matériau approprié, tel que le verre ou le polystyrène cristal.

Dans ce cas la membrane composite peut être fixée au tube à l'aide d'un manchon semi-rigide glissé autour du tube, comme un manchon en chlorure de polyvinyle.

Selon un second mode de réalisation de l'invention, le dispositif comprend une microplaque à 96 puits, munie à sa base d'une membrane composite telle que décrite ci-dessus. Dans ce cas la membrane est solidarisée par thermosoudage à la périphérie de chacun des puits.

Les réactifs nécessaires au test d'agglutination peuvent être disposés préalablement à la surface des billes ou ajoutés extemporanément avec les hématies ou les sérums à tester, ces réactifs pouvant être n'importe quel réactif mis en oeuvre à cet effet dans les techniques classiques.

Lorsque la phase d'incubation est achevée, le contenu du tube est soumis, à sa partie inférieure, à l'action d'un moyen permettant de déplacer la phase mobile, ledit moyen pouvant consister soit en un absorbant constitué de matière cellulosique à haut pouvoir de rétention d'eau, mis en place au contact du filtre, soit en une dépression créée dans une chambre mise au contact du filtre. Ce dernier moyen est préférentiellement mis en oeuvre lorsque la technique est automatisée.

Le dispositif selon l'invention permet d'effectuer la lecture du résultat à la surface des billes, une faible épaisseur de billes étant suffisante pour séparer les hématies libres des hématies liées. Une lecture par le dessus de l'ensemble des puits d'une microplaque est ainsi rendue possible tout en conservant une bonne sensibilité.

Le dispositif selon l'invention présente l'avantage d'être parfaitement autonome, ne nécessitant aucun matériel annexe tel qu'une centrifugeuse, en sorte qu'il peut être aisément mis en oeuvre hors du laboratoire.

Il présente également l'avantage d'offrir un champ d'application large, pouvant être utilisé aussi bien en sérologie (hémagglutination) que pour des groupages sanguins ou des recherches d'agglutinines irrégulières.

Il peut en outre être utilisé pour la mise en oeuvre de toutes les techniques connues d'agglutination, et il peut être aisément automatisé, notamment dans le cas où il est mis en oeuvre dans des microplaques 96 puits.

A ces avantages s'ajoute celui inhérent à la stabilité de l'image produite, les réactions restant visibles plusieurs heures.

Le procédé selon l'invention permet aussi d'éviter les phases critiques et longues que constituent les

lavages et la centrifugation; tout en conservant une grande sensibilité.

D'autre part, le où les tubes mis en oeuvre étant ouverts, le procédé selon l'invention permet de cumuler deux techniques connues en associant les deux réactifs correspondants, introduits successivement : on peut ainsi réaliser une technique mixte, par exemple en mettant en oeuvre le polybrène et une antiglobuline humaine.

Enfin, la mise en oeuvre de microbilles de verre permet de réaliser des dispositifs prêts à l'emploi, par exemple sous forme de microplaques à 96 puits dont chaque puits renferme une couche desdites microbilles, ce qui est impossible avec des microbilles de polymères, qui se rétractent en séchant.

Les exemples qui suivent sont fournis à titre d'illustration de la présente invention, vis-à-vis de laquelle ils ne présentent aucun caractère limitatif.

**EXEMPLE 1 :** réalisation d'une microplaque prête à l'emploi.

On réalise une microplaque à 96 puits selon l'invention en en obturant le fond à l'aide d'une membrane composite fixée par thermosoudage à la périphérie de chaque puits, et constituée des trois couches ci-après :

- polyamide 66 de porosité 5µ
- polypropylène
- polymère de tétrafluoroéthylène (PTFE), cette dernière couche étant percée au centre de chaque puits d'un orifice d'environ 0,1mm.

On dépose dans chaque puits 200 µl d'un mélange volume à volume d'eau et de billes de verre de diamètre 37 à 50 µ.

Après aspiration de l'eau à travers les orifices de la membrane, on sèche à l'étuve à 37 °C pendant une heure.

On obtient ainsi une plaque prête à l'emploi qui se conserve à température ambiante sans limite de temps.

**EXEMPLE 2 :** Groupage ABO et Rhésus Standard

Dans des puits adjacents d'une microplaque préparée selon l'exemple 1, on peut réaliser le groupage ABO et Rhésus Standard selon les techniques de Beth-Vincent et Simonin, simultanément.

1° Technique Beth-Vincent (Recherche des antigènes de type A ou/et B)

On introduit successivement :

- 50 µl d'hématies à tester, mises à 5 % dans une solution de broméline à 0,25 %
- 50 µl de sérums tests dilués anti A ou anti B ou anti AB.

On laisse incuber cinq minutes à 4° C puis on aspire sous vide de 10 cm Hg et l'on rince avec 500 µl de détergent "BRIJ 56" à 0,075 %.

La lecture du résultat s'opère aisément à la surface des billes de verre.

2° Technique Simonin (Recherche des anticorps de type A ou/et B)

On introduit successivement :

- 50 µl d'hématies tests, mises à 5 % dans une solution de broméline à 0,25 %
- 100 µl de sérum à tester

On laisse incuber cinq minutes à 4° C puis on aspire sous vide de 10 cm Hg et l'on rince avec 250 µl de "BRIJ 56" à 0,075 %

La lecture du résultat s'opère aisément à la surface des billes de verre.

3° Détermination du Rhésus Standard (Recherche des antigènes D)

On introduit successivement :

- 50 µl d'hématies à tester à 5 % dans une solution de "BRIJ 56" à 0,075 %
- 100 µl de sérum test anti D dilué

On laisse incuber cinq minutes à 4° C puis on aspire sous vide de 10 cm Hg et l'on rince avec 500 µl de "BRIJ 56" à 0,075 %.

La lecture du résultat s'opère aisément à la surface des billes de verre.

Lecture du résultat pour toutes les techniques utilisées :

- résultat positif : hématies agglutinées formant un tapis rouge à la surface des billes de verre
- résultat négatif : pas d'hématies visibles à la surface des billes de verre.

### EXEMPLE 3

Au fond de chaque puits d'une microplaque préparée selon l'exemple 1 on dépose successivement :

- Hématies tests à 3 % - 1 vol. (50 µl)
- Sérum à tester - 1 vol. (50 µl)
- Polybrène à 1 % - 1 vol. (50 µl)

On laisse incuber dix minutes à température ambiante, puis on aspire sous vide de 10 cm Hg.

On obtient des tapis cellulaires uniformes dans tous les puits, sur lesquels on ajoute 10 µl d'antiglobuline polyvalente, puis on remplit la totalité des puits avec une solution de lavage (citrate hypertonique) additionnée de TW20 à 1 % (U/U).

Après écoulement total de la solution de lavage, on procède à la lecture, en observant la partie supérieure de la couche de billes de verre.

te surmontée d'une couche de microbilles de verre de diamètre moyen compris entre 20 et 50 µm, ladite membrane composite comprenant les trois couches successives suivantes :

- 5 - une première couche très hydrophile, de porosité 5 à 7 µm, au contact des microbilles de verre.
- une seconde couche, intermédiaire, modérément hydrophobe.
- 10 - une troisième couche, externe, fortement hydrophobe, percée en son centre d'un orifice d'environ 0,1 mm de diamètre.

2) Dispositif selon la revendication 1, caractérisé en ce que la couche de microbilles de verre a une épaisseur de 2 à 3 mm.

3) Dispositif selon la revendication 1, caractérisé en ce que la première couche de la membrane composite est réalisée en polyamide 66 très hydrophile.

20 4) Dispositif selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que la deuxième couche de la membrane composite est réalisée en un matériau fibreux comme le polypropylène.

5) Dispositif selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que la troisième couche de la membrane composite est réalisée en un polymère de tétrafluoroéthylène (PTFE).

30 6) Dispositif selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, caractérisé en ce qu'il comprend un tube d'environ 60 mm de hauteur et d'environ 2 mm de diamètre interne, à l'extrémité inférieure duquel la membrane composite est fixée par tout moyen approprié.

7) Dispositif selon la revendication 6, caractérisé en ce que la membrane est fixée autour de la partie inférieure du tube à l'aide d'un manchon semi-rigide du type chlorure de polyvinyle.

8) Dispositif selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, caractérisé en ce qu'il comprend une microplaque à 96 puits dont l'extrémité inférieure est obturée par la membrane composite, fixée par thermosoudage à la périphérie de chaque puits.

### Revendications

1) Dispositif permettant de réaliser en un seul temps la séparation et la mise en évidence des agglutinats érythrocytaires lors des tests d'agglutination, caractérisé en ce qu'il comprend au moins un tube capillaire ouvert à son extrémité inférieure, laquelle est munie d'un filtre constitué d'une membrane compo-



Office européen  
des brevets

# RAPPORT DE RECHERCHE EUROPEENNE

Numero de la demande

EP 92 44 0126

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS			
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	Revendication concernée	CLASSEMENT DE LA DEMANDE (Int. Cl.5)
A	US-A-4 933 092 (D.L.AUNET ET AL.) * colonne 1, ligne 30 - colonne 2, ligne 31 * * colonne 2, ligne 56 - colonne 3, ligne 18 * * colonne 3, ligne 48 - colonne 4, ligne 22 * * colonne 5, ligne 30 - colonne 9, ligne 6 * * figures 1-5 * ---	1,3,6	G01N33/555 B01L3/14
A	EP-A-0 325 910 (ABBOTT LABORATORIES) * colonne 3, ligne 35 - colonne 4, ligne 21 * ---	1,4	
A	EP-A-0 131 934 (BAXTER HEALTHCARE, CORP.) * abstract * * page 6, ligne 11 - ligne 29 * ---	1,6	
A	DATABASE WPIL Week 8724, Derwent Publications Ltd., London, GB; AN 87-166227 & JP-A-62 097 603 (TERUMO CORP) 7 Mai 1987 * abrégé * ---	1,4	DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int. Cl.5)  G01N B01L
A	EP-A-0 269 240 (BIOTRACK, INC.) * le document en entier * -----	1,2	
Le présent rapport a été établi pour toutes les revendications			
Lieu de la recherche BERLIN		Date d'achèvement de la recherche 03 FEVRIER 1993	Examinateur DE KOK A.J.
<p><b>CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES</b></p> <p>X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire</p> <p>T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet antérieur, mais publié à la date de dépôt ou après cette date D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons &amp; : membre de la même famille, document correspondant</p>			

EPO FORM 1500 (10/92)

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**